

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C.20231
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 04 November 1999 (04.11.99)	
International application No. PCT/JP98/01712	Applicant's or agent's file reference FP-FY-0003
International filing date (day/month/year) 15 April 1998 (15.04.98)	Priority date (day/month/year)
Applicant HIDAKA, Hiroyoshi et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:
15 October 1999 (15.10.99)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

<p>The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland</p> <p>Facsimile No.: (41-22) 740.14.35</p>	<p>Authorized officer Antonia Muller</p> <p>Telephone No.: (41-22) 338.83.38</p>
--	--

THIS PAGE BLANK (USPTO)

RG

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 C12Q 1/68, G01N 33/53</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO99/53094</p> <p>(43) 国際公開日 1999年10月21日(21.10.99)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP98/01712</p> <p>(22) 国際出願日 1998年4月15日(15.04.98)</p> <p>(71) 出願人 ; および (72) 発明者 日高弘義(HIDAKA, Hiroyoshi)[JP/JP] 〒468-0063 愛知県名古屋市中区音聞山607番地 Aichi, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてののみ) 田中秀樹(TANAKA, Hideki)[JP/JP] 〒460-0012 愛知県名古屋市中区千代田2丁目14-21 Aichi, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 有賀三幸, 外(ARUGA, Mitsuyuki et al.) 〒103-0013 東京都中央区日本橋人形町1丁目3番6号 共同ビル Tokyo, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 CA, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: METHOD FOR <i>IN VIVO</i> DETECTING TARGET PROTEIN GENE BY DRUG</p> <p>(54)発明の名称 薬物の生体内における標的蛋白の遺伝子の検出方法</p> <p>(57) Abstract A method for <i>in vivo</i> detecting a target protein gene by a drug, which comprises binding an antigenic substance to a drug to be administered to a living organism via a chemical crosslinker, using the obtained material as a probe, and directly screening the gene of the protein bonded to the above probe by using a cDNA expression library containing genes of the living organism to which the drug is to be administered. Compared with the conventional drug-fixed column methods, the above method makes it possible to directly and conveniently isolate the gene of the target molecule without resort to the purification of the protein and the analysis of the amino acid sequence thereof.</p>		

(57)要約

本発明は、生体に投与される薬物にケミカルクロスリンカーを介して抗原性物質を結合させた物質をプローブとし、該被投与生体遺伝子を含有するcDNA発現ライブラリーを用いて該プローブと結合する蛋白質の遺伝子を直接スクリーニングする該薬物の生体内における標的蛋白遺伝子の検出方法に関する。

本発明によれば、これまでの薬剤固定カラム法に比べ蛋白精製、そのアミノ酸配列解析を必要とせず、更に、直接かつ簡便に薬物の標的分子の遺伝子を単離できる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BG	ブルガリア	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャード
BH	ブルハナ・ファソ	GM	ガンビア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサオ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HU	ハンガリー		共和国	TR	トルコ
CF	中央アフリカ	ID	インドネシア	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	IE	アイルランド	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CH	スイス	IL	イスラエル	MR	モリタニア	UG	ウガンダ
CI	コートジボアール	IN	インド	MW	マラウイ	US	米国
CM	カメルーン	IS	アイスランド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IT	イタリア	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CR	コスタ・リカ			NL	オランダ	YU	ユーゴスラビア
CU	キューバ	JP	日本	NO	ノルウェー	ZA	南アフリカ共和国
CY	キプロス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CZ	チェッコ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KR	韓国	RO	ルーマニア		

明 細 書

薬物の生体内における標的蛋白の遺伝子の検出方法

本発明は、薬物が生体に投与されたとき、生体内で結合する標的蛋白の遺伝子を直接検出する方法に関する。

背景技術

ある疾患に効果を示す薬物がある場合、その薬物が細胞内でどのような分子（蛋白質、核酸、脂質等）と結合し、その分子の機能をどのように変化させるのか、また、このことが薬効とどのようにむすびつくのか、これがすなわち薬物の作用機序であり、薬理学者が最も知りたい部分である。これまで薬物の細胞内標的分子、特に蛋白因子の同定には薬物固定カラムを用いてそれらの分子を細胞及び組織から直接単離する方法が主であった。

しかし、この方法では単離した蛋白因子を更に精製し、単一分子種にした後、更にアミノ酸配列解析を行う必要がある。アミノ酸配列決定には一般的に100マイクログラム程度の蛋白量が必要であり、このためには大量の細胞、組織を出発材料とする必要があった。また、アミノ酸配列が順調に決定されたとしてもその後、その分子の遺伝子を単離し、塩基配列を決定するにはかなりの時間と労力を要する。

従って、本発明は、薬物が生体内に投与されたとき、生体で結合する標的蛋白の遺伝子を直接検出する方法を提供することを目的とする。

発明の開示

そこで、本発明者は、種々検討した結果、薬物をケミカルクロスリンカーを介して血清アルブミン等の抗原性物質と結合させ、これをプローブとし、被薬物投

与生体、例えばヒトの遺伝子を多種含有する cDNA 発現ライブラリーを用いてスクリーニングすることにより、該薬物の標的蛋白遺伝子が直接検出できることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、生体に投与される薬物にケミカルクロスリンカーを介して抗原性物質を結合させた物質をプローブとし、該被投与生体遺伝子を含有する cDNA 発現ライブラリーを用いて該プローブと結合する蛋白質の遺伝子を直接スクリーニングすることを特徴とする該薬物の生体内における標的蛋白遺伝子の検出方法を提供するものである。

発明を実施するための最良の形態

本発明の遺伝子検出方法は、ある薬物を生体に投与したときに、該薬物が生体内で結合する標的蛋白の遺伝子を直接検出する方法であり、該薬物は、生体内、より好ましくは哺乳類、特に好ましくはヒトに投与される薬物である。該薬物としては、それ自体抗原性を有さない、すなわち、免疫原性を示さない非蛋白性物質であるのが好ましい。なお、吸収された後蛋白結合能を示さない薬物は、本発明には適用されないことはいうまでもない。

本発明においては、プローブとして該薬物にケミカルクロスリンカーを介して抗原性物質を結合させた物質を用いる。ここで、ケミカルクロスリンカーとしては、薬物の官能基と抗原性物質の官能基とを架橋する基であれば特に制限されず、例えばグルタルアルデヒド、ヘキサメチレンジイソシアナート、ヘキサメチレンジイソチオシアナート、N, N' -ポリメチレンビスヨードアセトアミド、N, N' -エチレンビスマレイミド、エチレングリコールビススクシンイミジルスクシナート、スルホスクシンイミジル-4-(p-マレイミドフェニル)ブチレート、ビスジアゾベンジジンなどが挙げられる。薬物に、これらの架橋剤と反応し得る官能基がない場合には、該薬物に官能基を化学的に導入する必要がある。この場合には、該官能基を導入しても薬物の生理活性等が消失しないことが条件と

なる。従って、薬物としては、これらの架橋剤と反応し得る官能基を有する物質であることが望ましい。

また、抗原性物質としては、プローブと結合する遺伝子のスクリーニングに抗原抗体反応を利用するのが便利であることから、それ自体免疫原性を有する物質であるのが望ましい。また、抗体が入手し易いこと、及び他の生体成分との結合性の少ない物質であるのが好ましく、かかる観点から血清アルブミン、フルオレセインイソチオシアナート（FITC）等が好ましく、ウシ血清アルブミン（BSA）が特に好ましい。BSAは、抗体の入手が容易であり、かつ血中の主たる蛋白成分であることから、他の生体成分との結合がほとんどないのでスクリーニング過程での非特異的バックグラウンドがないことから、特に好ましいものである。

薬物と抗原性物質との架橋反応は、用いる架橋化剤に応じて異なり、例えば溶液中、室温で攪拌すればよい。

用いるcDNA発現ライブラリーは、哺乳類遺伝子、特にヒト遺伝子を多種含有するライブラリーであることが好ましく、市販のヒト脳由来cDNAライブラリー、ヒト胎盤由来cDNAライブラリー等が挙げられる。かかるcDNAライブラリーとしては、プラスミド、ファージ等をベクターとするcDNAライブラリーが挙げられるが、ファージをベクターとするcDNAライブラリー、特にλファージをベクターとするcDNAライブラリーが好ましい。更には、クローニングのし易さから、大腸菌を宿主とするλファージをベクターとするcDNAライブラリーが好ましい。かかる市販品としては、例えばヒト胎盤／λTriplexライブラリー等が挙げられる。

該cDNAライブラリーから目的とする遺伝子のスクリーニングは、例えば次の如くして行われる。すなわち、cDNAライブラリーを宿主細胞とともに寒天培地上にまき、そこである程度ウイルスを増殖させた後、蛋白を産生させる。産生蛋白をニトロセルロース膜上に吸着、固定させる。この膜を前記のプロー

ブと反応させ、プローブの結合したファージのプラークをHRP (horse radish peroxidase) 等で標識した抗-抗原性物質抗体 (抗BSA抗体など) を二次抗体として化学発光法により検出する。同定したプラークよりDNAを回収し、その中に組み込まれた標的蛋白の遺伝子を常法により解析する。

上記のごとく、二次抗体を用いることなく、薬物をケミカルクロスリンカーを用いて直接、HRP等の酵素で標識することも考えられるが、この場合、化学反応により、酵素活性が喪失しないことが必要である。

薬物の標的蛋白の遺伝子が解析できれば、その推定アミノ酸配列から該標的蛋白は容易に判明する。

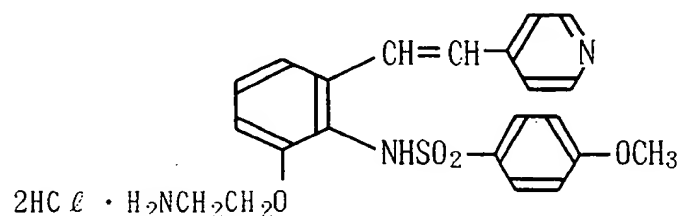
実施例

次に実施例を挙げて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に何ら制限されるものではない。

実施例 1

(1) 分子プローブの作製

薬物として、優れた抗癌作用を有することが知られている下記構造式を有する薬物 (A) を用いた。



ケミカルクロスリンカーとして、スルホスクシンイミジル-4-(p-マレイミドフェニル)ブチレート (Sulfo-SMPB) を用いた。また抗原性物質としてBSAを用いた。化合物 (A) 22mg及びSulfo-SMPB 10mgをリン酸バッファー (pH 7~9) 中、室温にて1時間攪拌した。次いでこれに

BSA 327mgを加え、室温で攪拌した。反応終了後、Kwik Sep™カラムにより脱塩して、プローブを約300mg得た。

(2) スクリーニング

cDNAライブラリーとして、クローンテック社製ヒト胎盤/ λ Tripl EXライブラリーを用いた。

まず、予備実験によりおよそ2万個の割合でファージのプラークが現れる程度のファージ力価を決定しておき、これを大腸菌に吸着させ直径145mmのLB寒天培地への軟寒天に混ぜてまいた。このプレートを8～10枚調製した。42℃で4時間培養の後、プラークが3～5mm程度にまで成長した時点で10mMイソプロピル- β -D-チオガラクトシド (IPTG) 溶液に30分浸しておいた直径132mmのニトロセルロース膜 (アマシャム社製 Hydbnd-C pure) を静かにのせる。この状態で更に37℃で4時間培養することにより蛋白質を産生させ、同時に膜へと吸着させる。その後、膜をはがし、TBST溶液 (組成は別に記載) で3回洗い、1%ゼラチン溶液で30分～1時間ブロッキングした。この操作は後に使う抗体の膜への非特異的吸着を抑えるものである。TBST溶液で2回洗浄し、プローブを体積比で1/1000量含むTBST溶液に蛋白質を保持した膜を浸す。実際にはプラスチックバック内に膜と最小限の体積の反応液 (膜1枚あたり1ml以下) を入れ、シールする。これを4℃で12時間以上又は室温で2時間以上振盪し、蛋白質とプローブを反応させた後、TBST溶液で洗う。次に、体積比で1/2500量の二次抗体 (HRP標識抗BSA抗体カペル社製、抗BSAウサギ抗体パーオキシダーゼ結合IgGフラクション) を含むTBST溶液中で、プローブを反応させたときと同様にして室温で2時間以上振盪し二次抗体を反応させる。TBST溶液で洗った後、プローブが結合したファージプラークを化学発光ECLシステム (アマシャム社製) により検出した。これまでの一連の過程が一次スクリーニングである。この段階では単一のプラークを回収することは不可能であるので、発光シグナルの検出された

プラーク（ポジティブクローン）を含む領域の寒天培地をプレートから切り出し、SM溶液（組成は別に記載）に浸し、4℃で12時間以上振盪し、そこに含まれるファージを回収する。このファージを用いて二次スクリーニングを行う。直径8.5mmのLB寒天培地に数十個から百個のプラークが現れる力価のファージを大腸菌に吸着させ、これを軟寒天と混ぜてまく。以後の操作は一次スクリーニングと同様であるが、二次スクリーニングの時のみプローブを反応させるときにBSAを結合させていない薬物Aをコンペティターとして10 μ M加えた。薬物に依存した結合であれば添加したBSA非結合型の薬物によりBSA結合型薬物の標的プラークへの結合が阻害され、シグナルが減弱する筈である。これにより薬物特異的な結合を確認し、単一ポジティブクローンを単離した。ここからマニュアルに従い蛋白質の遺伝子を回収し、その塩基配列を決定した。

なお、上記で使用した二次抗体、すなわちHRP標識BSA抗体は、ウイルス由来の蛋白質への非特異的結合成分を除去するために5プライム3プライム社製 Immobilized E. coli BNN97 lysate による吸収を行った後に使用した。また、上記で使用した試薬の組成は下記の通りである。

(a) TBST溶液

10 mM Tris-HCl (pH 8.0)

150 mM NaCl

0.05% Tween-20

(b) SM溶液

100 mM NaCl

10 mM MgSO₄

35 mM Tris·Cl (pH 7.5)

0.01% ゼラチン

その結果、薬物（A）が生体内で結合する標的蛋白は、チモシン β -10、NF- γ B、成長ホルモン及びグルココルチコイドホルモンであった。このうち、

NF- γ Bは核内転写因子で、これまでの薬剤カラム法では単離が困難と考えられるので、本発明方法によって細胞内含量の少ない因子でも検出できることが明らかとなった。

産業上の利用可能性

本発明によれば、これまでの薬剤固定カラム法に比べ蛋白精製、そのアミノ酸配列解析を必要とせず、更に、直接かつ簡便に薬物の標的分子の遺伝子を単離できる。また、細胞内存在量が少ないために精製の困難な核内転写因子等の細胞性因子を同定することも可能になった。

請 求 の 範 囲

1. 生体に投与される薬物にケミカルクロスリンカーを介して抗原性物質を結合させた物質をプローブとし、該被投与生体遺伝子を含有するcDNA発現ライブラリーを用いて該プローブと結合する蛋白質の遺伝子を直接スクリーニングすることを特徴とする該薬物の生体内における標的蛋白遺伝子の検出方法。
2. 抗原性物質が血清アルブミン又はフルオロセインイソチオシアネートである請求項1記載の検出方法。
3. cDNA発現ライブラリーが、ファージをベクターとするcDNA発現ライブラリーである請求項1又は2記載の検出方法。
4. 薬物が、非蛋白質であり、それ自体抗原性を有さない物質である請求項1～3のいずれか1項記載の検出方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP98/01712

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ C12Q1/68, G01N33/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁶ C12Q1/68, G01N33/53

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPI (DIALOG), BIOSYS (DIALOG), MEDLINE (STN), JICST File on Science and Technology (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	The Pharmaceutical Monthly, Vol. 36[10] (1994) Hiroyoshi Hidaka "Special issue on 'The 5th Symposium on Clinical Pharmacy' The forefront of molecular Pharmacology (in Japanese)", p.2245-2250	1-4
A	Agric. Biol. Chem., Vol. 51[2] (1987) N. Iwatsuki et al., "A Complete Rat Serum Albumin cDNA Clone Directly Identified by Immunological Screening of cDNA Expression Library" p.379-384	1-4
A	Mol. Gen. Genet., Vol. 213 (1988) G. Houlne et al., "Characterization of cDNA sequences for LHCI apoproteins in Euglena gracilis: The mRNA encodes a large precursor containing several consecutive divergent polypeptides" p.479-486	1-4
A	Anal. Biochem., Vol. 209[2] (1993) T.S. McClintock et al., "Functional Expression of Recombinant G-Protein-Coupled Receptors Monitored by Video Imaging of Pigment Movement in Melanophores" p.298-305	1-4

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
June 16, 1998 (16. 06. 98)

Date of mailing of the international search report
June 23, 1998 (23. 06. 98)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ C 1 2 Q 1 / 6 8, G 0 1 N 3 3 / 5 3

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ C 1 2 Q 1 / 6 8, G 0 1 N 3 3 / 5 3

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSYS (DIALOG), MEDLINE (STN),
JICSTファイル (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	月刊薬事, Vol. 36[10] (1994) 日高 弘義 「特集 第5回クリニカルファーマシーシンポジウムより 分子 薬理学の最前線」 p. 2245-2250	1 - 4
A	Agric. Biol. Chem., Vol. 51[2] (1987) N. Iwatsuki et al. 「A Complete Rat Serum Albumin cDNA Clone Directly Identified by Immunological Screening of cDNA Expression Library」 p. 379-384	1 - 4
A	Mol. Gen. Genet., Vol. 213 (1988) G. Houlne et al. 「Characterization of cDNA sequences for LHCI apoproteins in Euglena gracilis: The mRNA encodes a large precursor	

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

16.06.98

国際調査報告の発送日

23.06.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

上 條 肇

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	containing several consecutive divergent polypeptides」 p. 479-486	1 - 4
	Anal. Biochem. , Vol. 209[2] (1993) T. S. McClintock et al. 「Functional Expression of Recombinant G-Protein-Coupled Receptors MOnitored by Video Imaging of Pigment Movement in Melanophores」 p. 298-305	1 - 4

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

1627
RECEIVED

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

FEB 06 2001

(PCT Article 36 and Rule 70)

TECH CENTER 1600/2900

Applicant's or agent's file reference FP-FY-0003	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP98/01712	International filing date (day/month/year) 15 April 1998 (15.04.98)	Priority date (day/month/year)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12Q 1/68, G01N 33/53		
Applicant HIDAKA, Hiroyoshi		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 3 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 15 October 1999 (15.10.99)	Date of completion of this report 19 June 2000 (19.06.2000)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP98/01712

I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the claims:
pages _____, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International Application No.
PCT/JP 98/01712

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-4	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-4	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-4	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

The invention as described in Claims 1-4 is not disclosed in any of the documents cited in the international search report or in other documents deemed relevant to said invention, and could not be invented easily by a person skilled in the art by combining disclosures in these documents.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

45

特 許 協 力 条 約

09 / 647924

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
[PCT36条及びPCT規則70]

REC'D 18 AUG 2000

WIPO

PCT

出願人又は代理人 の書類記号 FP-FY-0003	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/ IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 98/01712	国際出願日 (日.月.年) 15.04.98	優先日 (日.月.年)
国際特許分類 (IPC) Int. Cl ⁷ C12Q1/68, G01N33/53		
出願人 (氏名又は名称) 日高弘義		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT36条) の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。
- ☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で ページである。
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
- I ☒ 国際予備審査報告の基礎
- II ☐ 優先権
- III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV ☐ 発明の単一性の欠如
- V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI ☐ ある種の引用文献
- VII ☐ 国際出願の不備
- VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 15.10.99	国際予備審査報告を作成した日 19.06.00	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 加藤 浩	4 B 9050
電話番号 03-3581-1101 内線 3448		

様式PCT/IPEA/409 (表紙) (1998年7月)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- | | | |
|-------------------------------------|----------------|----------------------|
| <input type="checkbox"/> 明細書 | 第 _____ ページ、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書 | 第 _____ ページ、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書 | 第 _____ ページ、 | 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 _____ 項、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 _____ 項、 | PCT19条の規定に基づき補正されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 _____ 項、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 _____ 項、 | 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面 | 第 _____ ページ/図、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面 | 第 _____ ページ/図、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面 | 第 _____ ページ/図、 | 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ ページ、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ ページ、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ ページ、 | 付の書簡と共に提出されたもの |

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条（PCT35条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲	1 - 4	有
	請求の範囲		無
進歩性 (IS)	請求の範囲	1 - 4	有
	請求の範囲		無
産業上の利用可能性 (IA)	請求の範囲	1 - 4	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明（PCT規則70.7）

請求の範囲1～4に記載された発明は国際調査報告に表示された文献及び当該発明に関連があると認められる文献に記載されておらず、かつ、それらの文献の記載を組み合わせるにより当業者にとって容易に発明できたものでもない。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT

EP



国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 FP-FY-0003	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP98/01712	国際出願日 (日.月.年) 15.04.98	優先日 (日.月.年)
出願人(氏名又は名称) 日 高 弘 義		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。
2. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。
3. ☐ この国際出願は、ヌクレオチド及び/又はアミノ酸配列リストを含んでおり、次の配列リストに基づき国際調査を行った。
 - ☐ この国際出願と共に提出されたもの
 - ☐ 出願人がこの国際出願とは別に提出したもの
 - ☐ しかし、出願時の国際出願の開示の範囲を越える事項を含まない旨を記載した書面が添付されていない
 - ☐ この国際調査機関が書換えたもの
4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。
☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。
☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。
6. 要約書とともに公表される図は、
第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。 ☒ なし
☐ 出願人は図を示さなかった。
☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁶ C12Q1/68, G01N33/53

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁶ C12Q1/68, G01N33/53

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSYS (DIALOG), MEDLINE (STN),
JICSTファイル (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	月刊薬事, Vol. 36[10] (1994) 日高 弘義 「特集 第5回クリニカルファーマシーシンポジウムより 分子 薬理学の最前線」 p. 2245-2250	1-4
A	Agric. Biol. Chem., Vol. 51[2] (1987) N. Iwatsuki et al. 「A Complete Rat Serum Albumin cDNA Clone Directly Identified by Immunological Screening of cDNA Expression Library」 p. 379-384	1-4
A	Mol. Gen. Genet., Vol. 213 (1988) G. Houlne et al. 「Characterization of cDNA sequences for LHCI apoproteins in Euglena gracilis: The mRNA encodes a large precursor	

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

16.06.98

国際調査報告の発送日

23.06.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

上 條 肇

4B

9453

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

THIS PAGE BLANK (USPTO)

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	containing several consecutive divergent polypeptides」 p. 479-486	1 - 4
	Anal. Biochem., Vol. 209[2] (1993) T. S. McClintock et al. 「Functional Expression of Recombinant G-Protein-Coupled Receptors MOnitored by Video Imaging of Pigment Movement in Melanophores」 p. 298-305	1 - 4

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/01712

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁶ C12Q1/68, G01N33/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁶ C12Q1/68, G01N33/53

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPI (DIALOG), BIOSYS (DIALOG), MEDLINE (STN), JICST File on Science and Technology (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	The Pharmaceutical Monthly, Vol. 36[10] (1994) Hiroyoshi Hidaka "Special issue on 'The 5th Symposium on Clinical Pharmacy' The forefront of molecular Pharmacology (in Japanese)", p.2245-2250	1-4
A	Agric. Biol. Chem., Vol. 51[2] (1987) N. Iwatsuki et al., "A Complete Rat Serum Albumin cDNA Clone Directly Identified by Immunological Screening of cDNA Expression Library" p.379-384	1-4
A	Mol. Gen. Genet., Vol. 213 (1988) G. Houlne et al., "Characterization of cDNA sequences for LHCI apoproteins in Euglena gracilis: The mRNA encodes a large precursor containing several consecutive divergent polypeptides" p.479-486	1-4
A	Anal. Biochem., Vol. 209[2] (1993) T.S. McClintock et al., "Functional Expression of Recombinant G-Protein-Coupled Receptors Monitored by Video Imaging of Pigment Movement in Melanophores" p.298-305	1-4

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
June 16, 1998 (16. 06. 98)

Date of mailing of the international search report
June 23, 1998 (23. 06. 98)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)